

耳鼻咽喉科感染症サーベイランスにおける 検出菌と耐性遺伝子

鈴木正樹 小上真史 保富宗城 平岡政信
島田純 藤原啓次 九鬼清典 山中昇

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科
日本耳鼻咽喉科研究会サーベイランス委員会

Molecular Genetic Analysis of Drug Resistant Microbes in Nationwide Surveillance

Masaki SUZUMOTO, Masashi OGAMI, Muneki HOTOMI, Masanobu HIRAOKA,
Jun SHIMADA, Keiji FUJIHARA, Kiyonori KUKI, Noboru YAMANAKA
Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Wakayama Medical
University, Wakayama

Recently, there has been an alarming increase drug-resistant pathogens in the upper respiratory tract infectious diseases in Japan.

This study analyzed the genetic characteristics and antimicrobial susceptibilities of major pathogens (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*) isolated from upper respiratory tract infections in the 3rd nationwide surveillance of Japan Society for Infectious Diseases in Otorhinolaryngology, 2003.

123 of 296 strains of *S. pneumoniae* (41.6%) had three PBP gene mutations, 22 (7.4%) strains exhibited no mutations. 76.6% strains classified into PSSP according to the criteria of the NCCLS possessed mutation in *pbp2x* gene.

211 of 315 strains of *H. influenzae* (67%) expressed one or two *ftsI* gene mutations and no *bla* genes, 96 (31%) had no mutations. Only 8 strains (2.5%) expressed *bla* genes.

2 strains (2.7%) of *Streptococcus pyogenes* possessed *ermB* gene, 3 isolates (4.1%) possessed *ermTR*. They were highly resistant to clarithromycin.

Physicians need to take into consideration of the high prevalence of drug-resistant microbes in URTI and should make an effort to appropriately use antibiotics in order to prevent the increase of drug-resistant bacteria.

はじめに

耳鼻咽喉科領域の多くは外界に接しており感染症の好発部位となる。なかでも *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* は上気道感染症の重要な起炎菌である。特に前二者については、薬剤耐性化が近年問題となっており、従来までは予後良好とされていた急性中耳炎においても経口抗菌薬の治療に関わらず改善しない遷延例や、感染を繰り返す反復例といった難治例が増加するなど上気道感染症の臨床像は大きく変化してきている^{1,2)}。

今回我々は、2003年度耳鼻咽喉科感染症研究会全国サーベイランスにおいて耳鼻咽喉科領域より採取された検体を用い、各検出菌の薬剤耐性化の現状を遺伝子解析により耐性遺伝子の側面から検討した。

対象と方法

2003年度耳鼻咽喉科感染症研究会全国サーベイランスにおいて耳鼻咽喉科領域より採取された *S. pneumoniae* 296株, *H. influenzae* 315株, *S. pyogenes* 73株を対象とした。各菌種の薬剤耐性化機構に着目し、*S. pneumoniae* に関してはペニシリン結合蛋白PBPの構造変化をきたす *pbp1a*, *2b*, *2x* 遺伝子の変異を、*H. influenzae* に関しては、TEM型βラクタマーゼをコードする *bla* 遺伝子の発現とペニシリン結合蛋白PBP3をコードする *ftsI* 遺伝子の変異の有無を、*S. pyogenes* に関してはマクロライド耐性遺伝子 *ermB*, *ermTR*, *mefA* 遺伝子の発現の有無をPCR法にて検討した。また、微量液体希釈法により *S. pneumoniae* に対してはペニシリンG, *H. influenzae* に対してはアンピシリン, *S. pyogenes* に対してはクラリスロマイシンに対する薬剤感受性を測定し、耐性遺伝子検索の結果との比較検討を行った。

結 果

S. pneumoniae

今回検討した *S. pneumoniae* 296株のうち123株(41.6%)が *pbp1a*, *2b*, *2x* の3遺伝子全てに変異を認めた。さらに、152株(51.4%)に1または2遺伝子変異を認め、なかでもセフェム耐性に関与する *pbp2x* 変異を含む株が135株(45.6%)と多く認められた。一方、遺伝子変異を来していない株はわずか22株(7.4%)であった。

各MICにおける遺伝子変異耐性菌の割合を比較したところ、アメリカ臨床検査標準委員会(NCCLS)の分類でPISPと分類される121株中にも、*pbp1a*, *2x*, *2b* の3遺伝子ともに変異をきたした菌株が66株(54.5%)と高率に存在した。また、NCCLSの分類ではPSSPと分類される111株のなかにも *pbp* 遺伝子変異株が多く見られ、特にセフェム耐性を示す *pbp2x* 遺伝子変異を含む株が85株(76.6%)と多くを占めていた(Fig. 1)。

H. influenzae

検討した315株の薬剤耐性の機序としてほとんどがβラクタマーゼ非産生(*bla* 遺伝子の発現なし)株で、*pbp* 遺伝子のうち、1遺伝子または2遺伝子変異であり、合わせて211株(67.0%)を占めていた。βラクタマーゼ産生株は8株(2.5%)と少数であった。NCCLS

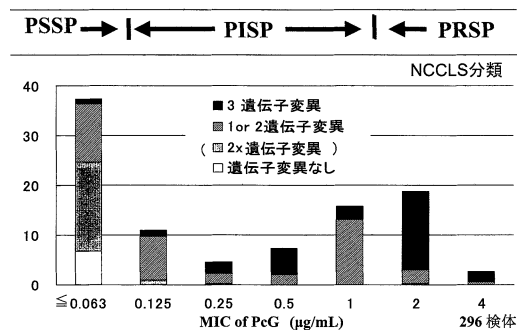


Fig. 1 Susceptibility to PcG and expression of *pbp* gene mutations

の *H. influenzae* 感受性分類と遺伝子変異の比較では、アンピシリンに対して、耐性遺伝子が増えるにつれ、耐性化のレベルも上昇していた。また、 β ラクタマーゼ産生遺伝子を有する株は高度耐性に位置していた。NCCLS 分類で BLNAS と分類される 185 株について遺伝子検索をおこなうと、89 株 (48.1%) が β ラクタマーゼ非産生で *pbp* 遺伝子のうち、1 または 2 遺伝子変異を来たしていた (Fig. 2)。

S. pyogenes

マクロライド耐性遺伝子発現では、2 株 (2.7%) に *ermB*, 3 株 (4.1%) に *ermTR* の発現を認めた。クラリスロマイシンに対する感受性試験の結果と比較するとマクロライド耐性遺伝子を発現した菌株ではクラリスロマイシンに対し高度耐性を示した (Fig. 3)。

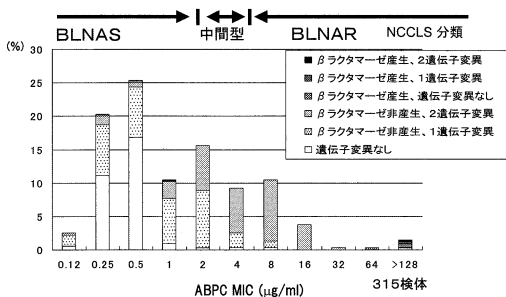


Fig. 2 Susceptibility to ABPC and expression of *bla* gene and *pbp* gene mutations

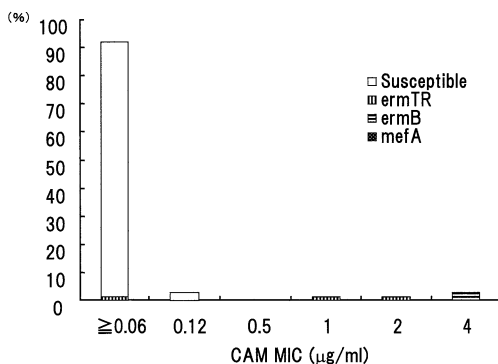


Fig. 3 Susceptibility to CAM and expression of macrolide resistant genes

考 察

β ラクタム系抗菌薬は *S. pneumoniae* の細胞壁構成酵素であるペニシリン結合蛋白 (PBP) を作用標的としている。薬剤耐性菌ではこの PBP を支配する遺伝子の変異により、PBP の構造変化が生じ、薬剤親和性が低下するため抗菌薬が酵素へ結合できなくなり、抗菌薬による溶菌が生じなくなると考えられている。特に薬剤耐性 *S. pneumoniae* では PBP1A, PBP2X, PBP2B の変化が重要となる^{3,4)}。

今回の *S. pneumoniae* の *pbp* 遺伝子検索の結果では *pbp* 遺伝子の変異頻度が増すにつれ MIC の上昇を認めた。また従来の MIC に基づく分類では PISP とされるものの中に *pbp1a*, *2x*, *2b* の 3 遺伝子ともに変異をきたした菌株が多く存在し、遺伝子学的には PRSP と差がないものと考えられた。さらに *pbp2x* 変異株はペニシリン系抗菌薬には感受性を示すことが多く、今回の検討でも NCCLS の分類では PSSP と分類される菌株のなかにも 76.6% の *pbp2x* 変異株を認めた。しかし、PBP2X はセフェム耐性に関与し *pbp2x* 変異株の多くはセフェム系抗菌薬に耐性を示すことに注意を要する。

薬剤耐性 *S. pneumoniae* の検出頻度は各国の β ラクタム系抗菌薬の使用頻度と密接に関連することが報告されており⁵⁾、*pbp2x* 変異株の高頻度の検出は我が国におけるセフェム系抗菌薬の乱用に起因することが示唆される。

H. influenzae の β ラクタム系抗菌薬に対する薬剤耐性化は β ラクタム環の阻害酵素である β ラクタマーゼの産生と *S. pneumoniae* と同様に β ラクタム剤の作用標的であるペニシリン結合蛋白 (PBP) の構造が変化し薬剤親和性が低下する機序の 2 つが報告されており、BLNAR の *pbp3* (*ftgI*) 遺伝子上には少なくとも 3 カ所に耐性化に影響する遺伝子変異が認められている^{6,7)}。これら耐性機序のうち、1974 年に米国でアンピシリン耐性菌が分離されて以来 β ラクタマーゼ産生による耐性化が中心とさ

れてきた。しかし欧米においては β ラクタマーゼ産生株が *H. influenzae* の30%以上に存在するのに対し、本邦では15~20%と分離頻度が低く β ラクタマーゼ産生以外の機序による耐性菌、すなわち(β -lactamase-negative ampicillin resistant *H. influenzae* (BLNAR)の増加が報告されている⁸⁾。今回の検討でも分離 *H. influenzae* の67%がラクタマーゼ非産生で *pbp* 遺伝子の変異を来した耐性菌であった。

S. pyogenes のマクロライド系抗菌薬に対する薬剤耐性化は1959年にエリスロマイシン耐性株が報告されて以来欧米を中心に広く認められた⁹⁾。本邦においては1970年代に高頻度に検出され約80%がエリスロマイシン耐性株と報告された¹⁰⁾。その後エリスロマイシンの使用頻度が減少するに伴い1980年代には数%にまで低下した¹¹⁾。しかし近年約2.8~6.5%とエリスロマイシン耐性株がわずかであるが増加していることが報告されている¹²⁾。*S. pyogenes* のマクロライド耐性遺伝子のうち *ermB*, *ermTR* 遺伝子は、本邦において1980年代に頻回に検出されたマクロライド耐性遺伝子であり、*mefA* 遺伝子は現在世界的にもっとも高頻度に検出されるマクロライド耐性遺伝子である。今回の検討では2.7%に *ermB*, 4.1%に *ermTR* の発現を認め、クラリスロマイシンに対し高度耐性を示した。従来までのエリスロマイシンにかわるニューマクロライド系抗菌薬の使用頻度の増加に伴いマクロライド系抗菌薬に対する薬剤耐性化が再び増加したものと考えられる。

本研究において上気道感染症の主要起炎菌のいずれにおいても、遺伝子レベルで薬剤耐性化が進行している現状が示された。今後これら起炎菌の耐性化を押さえるため抗菌薬の使用を減少させるエビデンスに基づいたガイドラインの作成とそれに基づく治療が重要になると思われる。

参 考 文 献

- 1) 山中 昇, 保富 宗城: 中耳炎難治化の要因, 小児科 1999; 40: 1093-9.
- 2) 山中 昇, 保富 宗城: 変貌する急性感染症—薬剤耐性菌への対策—, 耳鼻臨床 2000; 93: 431-7.
- 3) 生方公子, 紺野昌俊; ペニシリン耐性肺炎球菌の臨床分離株における薬剤耐性機構について—ペニシリン結合蛋白とPBP2B 遺伝子の解析—, Chemother 1994; 42: 1225-35.
- 4) 生方公子: 肺炎球菌におけるペニシリン耐性機構, 臨床と微生物 1995; 22: 137-44.
- 5) 山中 昇: 世界のペニシリン耐性肺炎球菌の現状, 山中昇(編) SCOM-027 変貌する急性中耳炎 pp.23-31 金原出版, 東京, 2000.
- 6) Ubukata K, Shibasaki Y, Kono M: Association of amino acid substitution penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, Antimicrob Agents Chemother 45: 1693-1699, 2001.
- 7) Ubukata K, et. al: Differentiation of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by a disc method, J Infect Chemother 8: 50-58, 2002.
- 8) 小栗豊子, 三澤成毅, 中村文子, 他: インフルエンザ菌の薬剤感受性—年次推移を中心に—, 化学療法の領域 1998; 7: 1147-56.
- 9) Low-iburry EJJ, Hurst L.: The sensitivity of staphylococci and other wound bacteria to erythromycin, oleandomycin and spiramycin, Journal of clinical pathology 1959; 12: 163-9.
- 10) Infectious Agents Surveillance Center: Epidemiology of streptococcal infections, Japan, 1991-1992, Infectious Agents Surveillance Report 1993; 14: 21-2.
- 11) Fujita K, Muroto K, et al: Decline of erythromycin resistant of group A streptococci in Japan, Pediatric Infectious Disease journal

1994; 13: 1075-8.

- 12) Kano S and Kimura T.: Prevalence of hemolytic streptococcal infection in Kitakyushu, incidence and characteristics of isolates (1994-1997) (in Japan). *Kansenshougaku Zashi* 2000; 74: 511-7.

連絡先：鈴木 正樹

〒640-0012

和歌山県和歌山市紀三井寺 811-1

和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科

TEL 073-441-0651

E-mail suzumoto@wakayama-med.ac.jp